

Potencialidad de la vinaza de *agave cocui* como medio para el crecimiento de *saccharomyces cerevisiae*

E.K. Chirinos León^{1*}, O. Pérez Ones², G. Barreto Argilagos³, P. Navas Yamarte⁴ y R. Sánchez Manzanares⁵

¹Departamento de Química, Universidad Politécnica Territorial "Alonso Gamero", UPTAG. Av. Libertador, Parque "Los Orumos", Coro, Falcón, Venezuela. ²Grupo de Análisis de Procesos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría", Cujae. Ave. 114, No. 11901 e/ Ciclovía y Rotonda. Marianao, La Habana, Cuba. ³Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias Aplicadas, Universidad de Camagüey "Ignacio Agramonte Loynaz", Camagüey, Cuba. ⁴Laboratorio de Investigación y Apoyo Docente (LIADSA), Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda", UNEFM, Coro, Falcón, Venezuela. ⁵Área de Ingeniería Ambiental, Universidad del Estado Falcón, UDEFA, Coro, Falcón, Venezuela.

Potential of Agave cocui vinasse as a crop for growth of Saccharomyces cerevisiae

Potencialitat de la vinassa d'Agave cocui com a medi per al creixement de Saccharomyces cerevisiae

RECEIVED: 15 JUNE 2020; REVISED: 11 NOVEMBER 2020; ACCEPTED: 8 DECEMBER 2020

SUMMARY

The present work evaluated the use of *Agave cocui* vinasse as a culture medium for the growth of *Saccharomyces cerevisiae*, for obtaining Pecayero cocuy. The experimental approach used to measure the effect of culture media and yeast strains on growth of *Saccharomyces cerevisiae*, where the response variable, the optical density (OD), was based on five levels set for the crop medium factor (0, 10, 20, 30 and 40% vinasse); represents zero SDB reference medium; three levels for factor strain (ATCC 49-21, and Sc.VINAZA UNEFM-16) with two replicates, for a total of 45 experimental units. A statistical analysis comparing several samples was used, using the statistical program Statgraphics Centurion XV, thereby allowing for more significant factors on the response variable. The growth of different strains of *Saccharomyces cerevisiae*, is favored among medium MSB and 40% vinasse, that provides the requirements for growth of these organisms. The differences between the phases of latency for each strain in different media show that the Sc. VINAZA performed better in most ways.

Keywords: vinasse, *Agave cocui*, culture medium, *Saccharomyces cerevisiae*.

RESUMEN

El presente trabajo evalúa el uso de vinaza de *Agave cocui* como medio de cultivo para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, en la obtención del cocuy pecayero. La metodología experimental utilizada para medir el efecto de los medios de cultivo y cepas de levadura, sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, siendo la variable respuesta la densidad óptica (DO), se basó en establecer cinco niveles para el factor medio de cultivo (0, 10, 20, 30 y 40 % vinaza); el cero representa el medio de referencia SDB; tres niveles para el factor cepa (ATCC 49-21, UNEFM-16 y Sc.VINAZA) con dos réplicas, para un total de 45 unidades experimentales. Se utilizó un análisis estadístico de comparación de varias muestras, a través del programa estadístico Statgraphics Centurion XV, que permitió establecer los factores de mayor significancia sobre la variable respuesta. El crecimiento de distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se ve favorecido en medio MSB y medio de vinaza al 40%, que aporta los requerimientos necesarios para el crecimiento de estos microorganismos. Las diferencias entre las fases de latencia para cada cepa en los distintos medios, demuestran que la Sc. VINAZA tuvo un mejor desempeño en la mayoría de los medios.

Palabras claves: vinaza, *Agave cocui*, medios de cultivo, *Saccharomyces cerevisiae*.

*Corresponding author: echirinosborges@gmail.com

RESUM

El present treball avalua l'ús de vinassa d'*Agave cocui* com a mitjà de cultiu per al creixement de *Saccharomyces cerevisiae*, en l'obtenció de l'cocuy pecayero. La metodologia experimental utilitzada per mesurar l'efecte dels medis de cultiu i soques de llevat, sobre el creixement de *Saccharomyces cerevisiae*, sent la variable resposta la densitat òptica (DO), es va basar en establir cinc nivells per al factor-medi de cultiu (0, 10, 20, 30 i 40% vinassa); el zero representa el mitjà de referència SDB; tres nivells per al factor soca (ATCC 49-21, UNEFM-16 i Sc.VINAZA) amb dues rèpliques, per a un total de 45 unitats experimentals. Es va utilitzar una anàlisi estadística de comparació de diverses mostres, a través del programa estadístic Statgraphics Centurion XV, que va permetre establir els factors de major significança sobre la variable resposta. El creixement de diferents soques de *Saccharomyces cerevisiae* es veu afavorit en un medi MSB i un medi de vinassa a 40%, que aporta els requeriments necessaris per al creixement d'aquests microorganismes. Les diferències entre les fases de latència per a cada soca en els diferents medis, demostren que la Sc. Vinassa va tenir un millor acompliment en la majoria dels medis.

Paraules clau: vinassa, *Agave cocui*, medis de cultiu, *Saccharomyces cerevisiae*.

1. INTRODUCCIÓ

La producció de etanol, para aplicacions industrials o bebides alcohòliques, ha augmentat significativament. En 2018, la cifra mundial llegó a 112 billions de litres produïdos, el 67 % obtinguda per fermentació i destilació¹, lo que representa un creixement del 7 %, en comparació amb el 2017. Existeix un nombre important de petites i mitjanes indústries a nivell mundial que produeixen etanol a partir de la fermentació de distintes matèries primeres (maíz, canya, uva, cebada, trigu i agave). En esta activitat, generen quantitats considerables (en una destileria tradicional se encuentra entre 6-15 L/L de etanol obtingut) de residuos líquidos (vinazas). Las características de las vinazas varían de acuerdo con la materia prima empleada, la localización y el tipo de proceso de fermentación adoptado².

El licor de cocuy pecayero es una bebida alcohólica que en el año 2001 recibió por el Servicio Autónomo de Propiedad Intelectual (SAPI) la denominación de origen, la cual sólo es producida a escala artesanal. De acuerdo con el número de productores registrados se calcula que actualmente se producen unos 50 000 L/año, por lo cual, los niveles de vinaza son de 600 000 L/año³, es decir, aproximadamente 12 L de vinaza / L de licor producido.

Según la caracterización físico-química, este desecho constituye un contaminante potencial de las aguas y los suelos donde se vierte, debido a sus bajos valores de pH (4,06) y elevada demanda química de oxígeno (DQO) 70 806 mg/L⁴, que superan los permitidos para

desechos líquidos vertidos directa o indirectamente a cuerpos de agua y que no deben exceder los 350 mg/L⁵.

Siendo la vinaza el principal efluente contaminante del proceso productivo de cocuy pecayero, es de gran interés revisar las diferentes opciones que existen en cuanto a la reutilización de dicho efluente.

Algunos estudios realizados, principalmente en vinazas de caña y de tequila, han propuesto diferentes alternativas de aprovechamiento entre las que destacan la fertirrigación⁶, para sustituir total o parcialmente otros fertilizantes, la digestión anaerobia para la producción de biogás^{7,8}, el compostaje^{9,10}, la concentración por evaporación hasta un 60 % para la combustión en calderas especiales para producir energía¹¹, la producción de levadura torula¹² y la recirculación al proceso de fermentación como sustituto del agua^{13,14}.

El presente estudio tuvo como propósito evaluar el uso de la vinaza de *Agave cocui*, como medio de cultivo para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, debido a que posee un alto contenido de micro y macro nutrientes que pueden favorecer el crecimiento de esta levadura. Esta alternativa puede aumentar la eficiencia de la conversión de jugo a mosto de *Agave cocui*, además de ser el punto de partida para la posible recirculación del desecho y para su reutilización en la obtención de proteína unicelular, producto usado para el engorde de animales, lo cual representa un valor agregado del proceso productivo a través de la posible comercialización del producto.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas

Se emplearon tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*): ATCC 49-21, proveniente del Laboratorio de Microbiología de la Universidad del Zulia (Sc. de Champan); UNEFM-16, cedida por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda", aislada en estudios anteriores del mosto de *Agave cocui*¹⁵ y *S. cerevisiae*, aislada de la vinaza de *Agave cocui* en el LIADSA-UNEFM codificada con el código Sc. VINAZA. Estas cepas fueron purificadas y aisladas a 30 °C, en *Sabouraud Dextrosa Broth* (SDB) y caldo de Papa Dextrosa (CPD) con 1,5 % v/v cloranfenicol (suspensión oral 125 mg/5 mL).

2.2 Medios de cultivo

Se utilizaron cinco medios de cultivo. El SDB, que es un medio de uso general para evaluar crecimiento de levaduras¹⁶, se le modificó su pH original hasta un valor de 4,5, constituyó el control positivo. A partir de este medio base se diseñaron otros cuatro a los que se incorporó vinaza de *Agave cocui* (10, 20, 30 y 40 % v/v) con 2 % (p/v) de dextrosa; en los mismos se sustituyó un 50 % de la dextrosa y la totalidad de la peptona por vinaza. Se estableció 40 % como porcentaje máximo, atendiendo al criterio de Romero y col.¹⁷ y Campos y Chirinos¹⁸, quienes refieren que altas concentraciones de vinaza de *Agave cocui* tienden a limitar el uso del desecho.

Los ajustes de pH se realizaron acorde a lo sugerido por Barreto¹⁶. Todos los medios, una vez preparados, se esterilizaron en autoclave, como se establece para medios convencionales. Luego se verificó que el pH (en los que incluían vinaza) se mantuviera en el valor establecido.

2.3 Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la vinaza de *Agave cocui*

En primer lugar, es importante mencionar que en el proceso artesanal de producción de cocuy pecayero, se generan dos tipos de vinaza, la vinaza tipo I (sin adición de azúcar al jugo de *Agave* durante el proceso de fermentación) y la vinaza tipo II (con adición de azúcar al jugo de *Agave* durante el proceso de fermentación). La población estuvo compuesta por los 25 alambiques, cuya vinaza representa aproximadamente un volumen de 175 litros por cada destilación¹⁹.

Como criterio de inclusión se utilizó la vinaza de *Agave cocui* tipo II. Se seleccionaron al azar siete alambiques (7, 8, 12, 13, 14, 18 y 20) mediante la técnica de números aleatorios de la hoja de cálculo Excel. De cada alambique se tomó una muestra; se les midió *in situ*: pH (pHmetro de campo marca HANNA, $1-4 \pm 0,01$); conductividad eléctrica (conductímetro de campo HANNA $19,99 \text{ mS/cm}-1999 \mu\text{S/cm} \pm 0,01$); °Brix (refractómetro de campo marca ATC $\pm 0,2$ °Brix) y temperatura (termómetro digital DeltaTRAK de -50 a $200 \pm 0,1^\circ\text{C}$).

Posteriormente, apoyados en Statgraphics Centurion XV, por medio del análisis de varianza del factor alambique, para cada una de las variables evaluadas, se realizó la comparación de las muestras para establecer si existen o no diferencias significativas entre las medias de cada respuesta en los alambiques seleccionados y validar el empleo de una muestra compuesta, preparada con los volúmenes tomados de los diferentes puntos de muestreo.

Las mediciones para la caracterización fisicoquímica de muestras de vinaza de *Agave cocui* se analizaron por triplicado. A su vez se realizaron observaciones microscópicas directas (campo claro) para verificar la presencia de hongos y bacterias, empleando un microscopio SIEMS-10 con una amplificación máxima de 400X.

El aislamiento y cultivo consistió en diluciones decimales (1.10^{-1} , 1.10^{-2} , 1.10^{-3} , 1.10^{-4}) de muestras de vinaza que se extendieron sobre *Sabouraud Dextrosa Agar* (SDA), mediante el empleo de espátulas de Drigalsky¹⁶. Cada dilución contó con dos réplicas. Todas las placas se incubaron a 30°C ²⁰ durante 72 h para la observación de las características macroscópicas de las colonias formadas. Solo se contemplaron aquellas placas correspondientes a diluciones en las que se apreciaron colonias independientes bien definidas. A todas las colonias de hongos (mohos o levaduras) se les determinó su diámetro, textura, color, producción de pigmentos y si los mismos difundían al medio de cultivo, necesario para su caracterización macroscópica. En las correspondientes a bacterias se estableció su diámetro, tipo de bordes, color y textura (lisa o rugosa).

La caracterización microscópica consistió en realizar frescos con lactofenol, a partir de las colonias con fenotipo

fúngico, para establecer en el caso de los mohos: el tipo de micelio (septado o aseptado) y la presencia de hifas reproductoras; para las levaduras: la forma de las células, la presencia de pseudomicelio o de yemas. Todos los aislamientos con fenotipo levaduriforme se pasaron en paralelo a agar *Corn Meal* y agar Gorodkova para inducir la producción de ascosporas, aspecto que luego se confirmó mediante el método de Bartholomew y Mittwer¹⁶.

Para evaluar la capacidad fermentativa, la levadura se sembró en ocho tubos de fermentación con tubos Durham en su interior. El medio empleado para la fermentación fue caldo cerebro-corazón de Merck 25 g, extracto de levaduras 5 g, glucosa 10 g, azul de bromotimol 0,05 g.L⁻¹, a pH 7. Todos los tubos se incubaron a 30°C durante 72 h.

2.4 Potencialidad de la vinaza como medio de cultivo para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

Para confirmar las potencialidades de la vinaza como medio de cultivo se utilizaron tres cepas de esta especie a las que, previo al ensayo, se les realizó pases por el medio en el que se evaluaría su crecimiento.

Mediante el empleo de una cámara de Neubauer se realizaron los recuentos pertinentes para garantizar que en cada medio se inoculara con un número de unidades formadoras de colonias de levadura/mL equivalente. De esta forma, cada una de las cinco variantes de medio de cultivo se sembró con cada una de las tres cepas. A partir del propio instante de la inoculación se realizó la primera medición de DO, mediante el empleo de un turbidímetro digital, con precisión de 0,01 y a una longitud de onda 660 nm. Las lecturas se repitieron cada una hora durante las primeras 12 h y cada 12 h durante un período de cinco días, para un total de 990 mediciones. Se emplearon cinco controles para medio de cultivo, consistente en el propio medio sin sembrar y que actuaron como el correspondiente blanco para las mediciones de DO. La temperatura se estableció como variable control, el sistema experimental fue colocado en la incubadora a 150 min^{-1} y 30°C ²¹.

Para medir el efecto de los medios de cultivo y cepas de levadura, sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, siendo la variable respuesta la DO, se establecen cinco niveles para el factor medio de cultivo (0, 10, 20, 30 y 40 % vinaza); el cero representa el medio de SDB; tres niveles para el factor cepa con dos réplicas, para un total de 45 unidades experimentales. El volumen de la unidad experimental fue de 20 mL, el 10 % de este, representó el inóculo añadido.

Se construyeron a través de Excel, las curvas de crecimiento de las cepas, que permiten comparar su cinética de crecimiento en los diferentes medios de cultivo. Se utilizó un análisis estadístico de comparación de varias muestras de los datos de DO, obtenidos por cada medio de cultivo y tipo de cepa, solo para el tiempo donde fue alcanzada la fase estacionaria de forma similar por los distintos tipos de cepa. Fue necesario en primer lugar, determinar si estos se ajustaban a una distribución normal, de ser así, se aplicaría un análisis de varianza simple por cada factor, en caso contrario, se emplearía

la prueba de Kruskal-Wallis, como criterio comparativo. Se empleó Statgraphics Centurion XV, para una probabilidad del 95 %, lo que permitió establecer los factores de mayor significancia sobre la variable respuesta.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la vinaza de *Agave cocui*

A partir de los parámetros fisicoquímicos de la vinaza recolectada, se realizó la comparación de las muestras y se estableció que no existen diferencias significativas entre las medias de cada respuesta para los siete alambiques seleccionados, puesto que el valor-P (razón-F) $\geq 0,05$ (Tabla 1). Esto valida el empleo de una muestra compuesta de vinaza en la caracterización y su uso en la fase experimental.

Tabla 1. Comparación de muestras para los diferentes parámetros analizados por alambique

Parámetro	Razón-F	Valor-P
^o Brix	0,83	0,5638
Conductividad eléctrica (mS/cm)	2,61	0,0651
Temperatura (°C)	0,86	0,5464
pH	2,68	0,0600

Las características fisicoquímicas analizadas de la muestra compuesta y su comparación con los límites permisibles estipulados (LPN)⁵ se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Características fisicoquímicas de la vinaza de *Agave cocui*

Parámetro	Promedio*	Desviación estándar	LPN
Azúcares totales, AT (%)	0,35	$\pm 0,02$	-
Sólidos totales, ST (mg/L)	7 500	+/-35	-
Sólidos suspendidos, SS (mg/L)	3 950	+/-40	80
DQO (mg/L)	17 960	+/-1 692	350
Fósforo (mg/L)	0,10	+/-0,01	10
Nitrógeno total (mg/L)	650	+/-40	40
pH	3,68	+/-0,01	6-9
Conductividad eléctrica (mS/cm)	4,23	+/-0,01	-
Sulfatos (mg/L)	442,20	+/-5,86	1000
Carbono orgánico total (%)	2,41	+/-0,03	-

*El valor señalado es el promedio de los triplicados de cada parámetro analizado

La composición de la vinaza es variable de acuerdo con el tipo de cocuy que se produzca. En el caso de cocuy tipo II se agrega azúcar comercial en la etapa de fermentación. El porcentaje de AT (0,35 %) es indicativo de que parte del azúcar usado para la fermentación no es metabolizada por los microorganismos, lo que provoca una posible inhibición por sustrato y se refleja en los altos tiempos de fermentación (5-8 días) y los bajos rendimientos de etanol en el proceso artesanal (5,5-7,85 %). Los ST de la vinaza de *Agave cocui* son menores a los reportados para las vinazas tequileras

(39 910 mg/L), probablemente por alguna práctica operacional distinta²². Los SS, además de que superan el valor establecido⁵, representan un 50 % de los ST del efluente, justificando la posibilidad de emplear un pretratamiento (filtrados, tanque equalizador, tanques de sedimentación-floculación) donde se removería parte importante de la carga orgánica del desecho para facilitar su tratamiento o reutilización.

Comparativamente tanto la vinaza tequilera como la del *Agave cocui* poseen características semejantes en cuanto los parámetros fisicoquímicos. El intervalo para la DQO es muy amplio, fundamentalmente por el tiempo de reposo en el alambique, tipo de bebida (pura o con azúcar adicionada), tratamiento preliminar a la muestra (tiempo de decantación y tamaño del tamiz en el filtrado) y tiempo de conservación de la muestra desde su recolección directa en el campo hasta el momento de la medición.

En el caso de la vinaza de *Agave cocui*, el valor promedio de DQO fue de 17 960 mg/L, menor que los reportados para tequilas y tequilas 100 %, 55 214 mg/L y 66 257 mg/L respectivamente²². Considerando que es vinaza tipo II, la cantidad de fibra es menor, por lo que produce una menor DQO. Sin embargo, dicho resultado excede el valor máximo permisible estipulado en la norma venezolana de descargas a cuerpos de agua y/o suelos (350 mg/L).

El valor experimental promedio de pH (3,68) de la muestra confirma lo reportado por otros autores^{19,22}, característica común de vinazas obtenidas de diferentes materias primas. La presencia de sales en la vinaza, reflejada en el alto valor de conductividad, está asociada al tipo de agua utilizada para la elaboración de la bebida y los suelos donde se cultiva la planta de *Agave*. Según López y Morales²³, provienen de fuentes naturales de la zona, y sin ningún tratamiento previo, es decir, son aguas de alto tenor salino. Se observaron concentraciones promedio de sulfatos (442,20 mg/L) por debajo del valor máximo aceptable (1 000 mg/L). El sulfato es un ión permanente y no tóxico; sin embargo, las altas concentraciones del mismo pueden desequilibrar el ciclo natural del sulfuro²⁴. El contenido de carbono orgánico total está íntimamente relacionado con la materia orgánica presente y puede favorecer el crecimiento de los microorganismos, siempre y cuando sea de fácil degradación.

3.2 Caracterización microbiológica

La caracterización de los microorganismos a partir de sus características macroscópicas y microscópicas, posibilita inferir los posibles usos biotecnológicos que se den a este desecho. Las observaciones directas al microscopio óptico mostraron la existencia de restos de mohos y abundantes levaduras; este hallazgo motivó la realización de siembras en SDA que permitieron precisar el predominio de hongos levaduriformes en relación a los filamentosos; se encontraron escasas bacterias. Las principales características de estos hallazgos se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3. Principales características de la microbiota presente en la vinaza

Características macroscópicas	Características microscópicas	Tipo de microorganismo
Colonias pequeñas, blancas y cremosas	Micelio unicelular, de forma ovoide, sin yemas ni pseudomicelio	Levaduras
Colonias pequeñas blancas de textura aterciopelada.	Micelio vegetativo septado, sin fíbulas; hifas conidióforas cortas terminadas en una cabeza conidial cubierta de conidiosporas.	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Colonias pequeñas, de bordes regulares, aspecto cremoso y color beige.	Bacilos gramnegativos rectos, aislados o agrupados en parejas	Bacterias
Colonias de aspecto terroso, blancas con partes amarillas y negras; al pasar los días se tornan negras. Producen pigmentos amarillos que difunden al medio de cultivo.	Micelio vegetativo septado, sin presencia de fíbulas; abundantes hifas conidióforas transparentes con conidiosporas negras en torno a la cabeza conidial.	<i>Aspergillus niger</i>
Colonias de aspecto terroso, color verde oliva, con zonas amarillas hacia el centro.	Micelio vegetativo septado, sin fíbulas; hifas conidióforas transparentes con conidiosporas verde oscuro en torno a la cabeza conidial.	<i>Aspergillus flavus</i>

Aunque la diversidad microbiana en la muestra pueda parecer excesiva y, en extremo heterogénea, realmente en el caso de los mohos, representantes a los que se pudo identificar de forma más precisa, se trata de especies muy frecuentes en la microbiota epifítica y en los suelos; algo también extensible a las levaduras, máxime cuando las características de ese medio les son favorables¹⁶. En su mayoría muestran similitudes con lo descrito para *Saccharomyces cerevisiae*. Las bacterias gramnegativas pueden acceder por igual vía. Vale aclarar que, el medio SDA, utilizado para este estudio, limita el crecimiento de este tipo de microorganismos, por lo que puede inferirse que la presencia bacteriana en este tipo de producto puede ser aún mayor¹⁶.

3.3 Verificación de género y especie de levaduras aisladas de la vinaza

Todos los aislamientos compatibles con levadura muestran características macroscópicas y microscópicas coincidentes con las descritas para *S. cerevisiae*. La siembra en agar *Corn Meal* y agar Gorodkova para inducir la producción de ascosporas, puso de manifiesto la presencia de las mismas, un rasgo que, aunque no exclusivo de *Saccharomyces*, apunta a favor de este género²⁵. Igualmente, la prueba de FUBA, (medio de cultivo harina de maíz con 1 % tween 80); para la promover la formación de pseudomicelio, resultó negativa, otro elemento coincidente con *S. cerevisiae*. Al verificar la capacidad fermentativa de la levadura aislada de la vinaza de *A. cocui*, se constató que, transcurridas las primeras 24 h, había abundante producción de dióxido de carbono en seis de los ocho tubos utilizados (75 %).

3.4 Potencialidad de la vinaza como medio de cultivo para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

A partir de estos resultados se analizó la cinética de crecimiento de las diferentes cepas de levaduras en cada medio de cultivo (ver la Figura 1).

Se puede evidenciar la existencia predominante de dos de las cuatro fases características de crecimiento de microorganismos, como lo son la fase exponencial y la fase estacionaria. La fase de crecimiento inicia en la hora cero y la estacionaria a las 12 h. La fase de muerte no es

visualizada ya que este crecimiento se midió a través de un método indirecto. Se realizó la pre-adaptación de las cepas en los diferentes medios, antes de su inoculación, esto con la finalidad de poder observar la fase de latencia, esta fue de aproximadamente una hora, luego iniciaron su crecimiento exponencial.

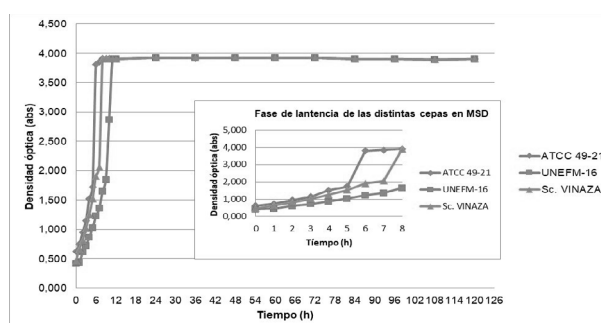


Figura 1. Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio SDB

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado por Pérez y Matallana²⁶; pues es común no encontrar fase de latencia para crecimientos en caldos nutritivos a temperatura óptima. Entre las dos y 12 h, se presenta un crecimiento exponencial que define la cinética de crecimiento de las cepas de levadura en este medio; se puede inferir que durante este tiempo todos los microorganismos están vivos. La fase de latencia final comienza entre las 12 y 120 h, en esta fase las levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* crecen y mueren a la misma velocidad, por lo tanto, la velocidad de crecimiento es igual a la velocidad de muerte, manteniéndose constante el valor de la DO.

Comparando el crecimiento de las distintas cepas en este medio, la cepa ATCC 49-21, es una levadura que se emplea en la industria del etanol, por lo tanto, presenta gran capacidad de crecimiento, producción de etanol; y tolerancia elevada al mismo, cuando se crece en sistemas discontinuos en los que están presentes sustratos ricos en carbohidratos, como sucede con el medio SDB. Graficando el logaritmo neperiano de la DO contra el tiempo (ver Figura 2) se puede comprobar que el comportamiento de las cepas en este medio sigue

una cinética de primer orden, propio de bacterias y levaduras cuando se les evalúa en condiciones como las analizadas.

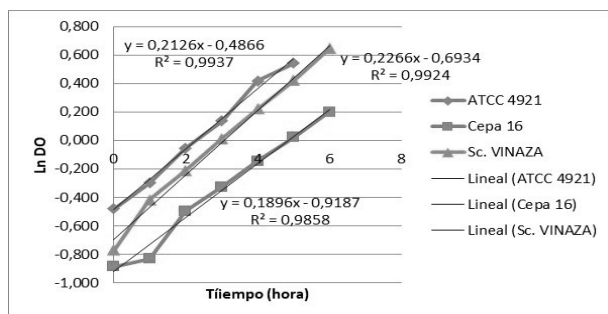


Figura 2. Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio SDB

A partir del ajuste lineal obtenido, se observa que el mayor lo tiene la ATCC 49-21, seguida por la Sc. VINAZA y la UNEFM-16. Se puede establecer que poseen un comportamiento similar, es decir, una velocidad específica de crecimiento similar en este medio y que su proceso de metabolización de carbohidratos y nutrientes están en función del tiempo. Este resultado demuestra la existencia de potencialidades muy semejantes en las cepas analizadas no solo en lo referente a su capacidad para metabolizar las fuentes carbonadas orgánicas presentes en el medio donde se crecen, también, una tolerancia compatible frente a los factores adversos que se van concentrando en ese sistema cerrado, uno de ellos el propio etanol¹⁶.

Al realizar un estudio análogo, pero utilizando como sustrato el medio de cultivo elaborado con vinaza al 10 %, se pudo constatar en la Figura 3 un crecimiento muy superior en el caso de la cepa Sc. VINAZA; la UNEFM-16 superó ligeramente a ATCC 49-21.

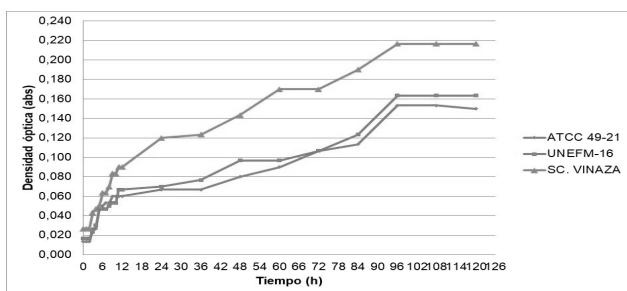


Figura 3. Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio vinaza *Agave cocui* 10 %

La fase de adaptación es mayor, aproximadamente cuatro horas. El crecimiento es difuso en comparación con el medio Sabouraud dextrosa y se evidenciaron algunas fases de diauxia; en esta fase la levadura es selectiva para uno de los sustratos, usándolo hasta agotarlo y una vez que esto sucede, comienza a metabolizar el otro, promoviendo su crecimiento; esto es producto de los diferentes sustratos del medio que pueden ser utilizados como fuente de carbono. No se presenta una marcada fase exponencial, por lo tanto, no se puede establecer la cinética por la cual se rigen.

La ATCC 49-21, fue más susceptible en sustratos complejos como la vinaza, considerando que su crecimiento normalmente es promovido en medios ricos en carbohidratos, pudiéndose inferir que este sustrato no es de fácil metabolización para una levadura que está acostumbrada a crecer en sustratos ricos de fuentes de glucosa; mientras que la Sc. VINAZA fue aislada de la vinaza y es capaz de crecer bajo limitaciones de carbohidratos libres²¹, obtuvieron datos similares para *Saccharomyces boulardii*, la levadura de referencia usada en la evaluación de melaza de caña como sustrato.

La baja concentración de inóculo, permitió llevar un seguimiento del crecimiento de las levaduras en este medio, por lo que las absorbancias iniciales son bajas; en microbiología predictiva lo que interesa modelar es la fase de latencia, aceleración y logarítmica a partir de muy bajas concentraciones microbianas iniciales²⁷.

En la Figura 4 se muestra el crecimiento de las tres cepas de levadura empleadas en la investigación en medio al que se ha incrementado la concentración de vinaza (medio de *Agave cocui* al 20%).

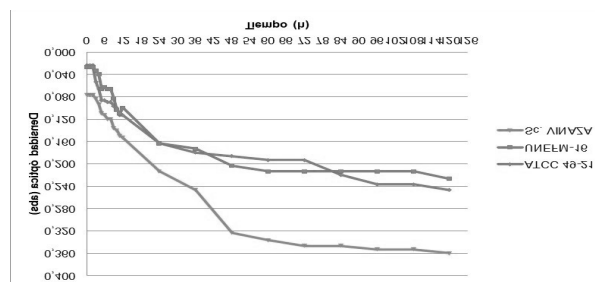


Figura 4. Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio vinaza *Agave cocui* 20 %

Como era de esperar, aunque se repiten los comportamientos descritos en la experiencia anterior, el incremento poblacional de la cepa Sc. VINAZA es mucho más intenso y lo logra en un tiempo menor.

La fase de latencia es de aproximadamente tres horas para las tres cepas. Los períodos de diauxia se observan principalmente para la UNEFM-16 y ATCC 49-21 y para la Sc. VINAZA, solo en las primeras 12 h. La fase estacionaria es alcanzada en tiempos diferentes, la UNEFM-16 alcanzó esta fase a las 60 h, mientras que para la ATCC 49-21 y Sc. VINAZA no está bien definida en el tiempo final del experimento, es decir, que entre las 72 y 120 h se presenta un crecimiento difuso de estas cepas y a pesar de que las variaciones de densidad óptica son bajas van en aumento.

Otra evidencia de lo antes expuesto, la constituye el comportamiento de la cinética de crecimiento de estas cepas en un medio de vinaza más concentrado, vinaza al 30 % (Figura 5); que muestra una disminución de dos horas de la fase de latencia en comparación con el medio al 20 % vinaza; Sc. VINAZA no presentó fase de adaptación.

Los períodos de diauxia son menores para ATCC 49-21, UNEFM-16 y Sc. VINAZA, esto principalmente se debe a que a mayores concentraciones de vinaza el sustrato aporta los componentes que necesitan para

su crecimiento. La fase exponencial es alcanzada en tiempos diferentes.

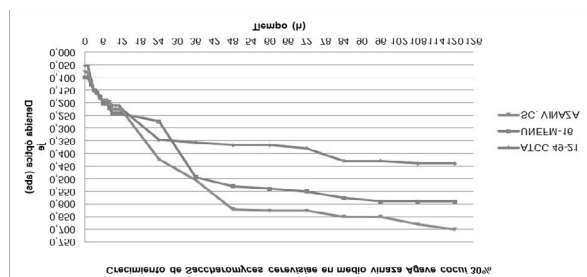


Figura 5. Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio vinaza *Agave cocui* 30%

La levadura Sc. VINAZA inicia su fase exponencial más marcada a las 12 h, la UNEFM-16 a las 24 h, ATCC 4921, no presentó una diferenciada fase exponencial. Los resultados permiten deducir que probablemente la ATCC 49-21 y UNEFM-16 son más susceptibles a variaciones de pH y fuentes de nitrógeno, ya que el crecimiento de estos microorganismos en medio Sabouraud fue similar, teniendo en cuenta que la glucosa es una fuente de fácil asimilación, en comparación con las fuentes carbonadas de la vinaza.

Para el medio de mayor concentración, al 40 % en vinaza, los resultados (Figura 6) revelan un mayor crecimiento, los valores de DO alcanzados al culminar la fase exponencial son mayores, alrededor de 1,55-1,85 unidades de absorbancia. La fase de latencia fue de aproximadamente una hora. Cáceres y López²⁷ confirman que la DO aumenta a medida que la cantidad de microorganismos se incrementa; el medio resulta cada vez más turbio haciendo por ende aumentar su absorbancia. La fase de adaptación de las cepas es semejante, al igual que su fase exponencial y el tiempo en el que alcanza la fase estacionaria que fue de 24 h.

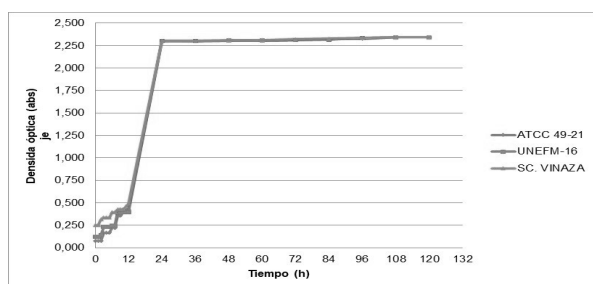


Figura 6. Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio vinaza *Agave cocui* 40%

El análisis estadístico de comparación de varias muestras, permitió realizar pruebas para determinar si existen diferencias significativas entre las medias, varianzas y/o medianas del crecimiento alcanzado por las distintas cepas de levadura a las 96 h, tiempo en el que es alcanzada la fase estacionaria para las distintas cepas. La entrada de datos al programa se realizó colocando las observaciones de DO en una sola columna y en la otra se indicó a que cepa pertenecía, para los distintos tiempos de medición. Se realizó en primer lugar una prueba para establecer si los datos se ajustan a una distribución normal, esto con la finalidad de validar

las pruebas estadísticas realizadas con referencia a la desviación estándar.

Tomando en cuenta que el sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada se encuentran fuera del rango de -2 y +2, se verificó que los datos no siguen una distribución normal, por lo tanto, el análisis de varianzas se realizó a través de la comparación de medianas, empleando la prueba de Kruskal-Wallis, como criterio comparativo. La prueba de Kruskal-Wallis permitió evaluar la hipótesis nula de que las medianas de la DO para el tipo de cepa es la misma. El estadístico de comparación de rangos fue de 1,0504 y valor-P de 0,5914, por lo tanto, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas, es decir, el tipo de cepa no influye sobre la variable respuesta densidad óptica.

También se aplicó un análisis de comparación de muestras del factor medio de cultivo sobre la variable respuesta densidad óptica a las 96 h, aplicando los criterios establecidos para distribuciones no normales. El estadístico de comparación de rangos fue de 41,31 y valor-P de $2,31 \cdot 10^{-8}$, por lo tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas, es decir, el factor medio de cultivo influye sobre la variable respuesta densidad óptica. En la Figura 7, se puede apreciar lo mencionado.

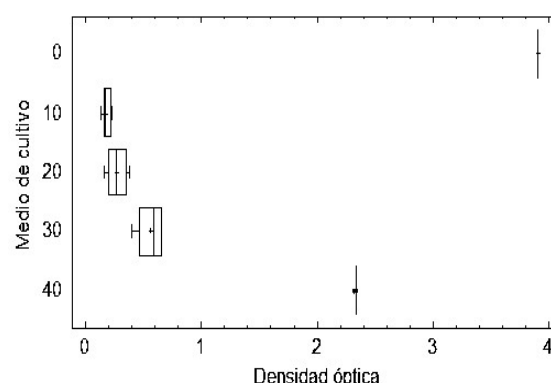


Figura 7. Caja y bigotes para densidad óptica por medios de cultivo

El gráfico de cajas y bigotes (Figura 7) permitió visualizar cuáles medianas son significativamente diferentes, unas de otras. Entre los medios vinaza al 10, 20 y 30 %, no existen diferencias significativas, estas se presentan entre estos niveles, y los niveles al 40 % y SDB. No es comparable la respuesta del medio vinaza al 40 % con el SDB, sin embargo, estos resultados confirman que este medio favorece en gran medida el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. Sanz y col.²⁸ reportan similares resultados para vinazas de caña.

4. CONCLUSIONES

1. El análisis de las características fisicoquímicas de la vinaza, permite establecer que su descarga en el suelo y cuerpos de agua, viola la normativa ambiental vigente, por lo tanto, es necesario la implementación de alternativas de aprovechamientos y/o tratamiento de este residual.

2. Según el estudio de la flora fúngica, realizado a la vinaza de *Agave cocui*, se evidencia que las levaduras representan los microorganismos predominantes en este residual, a su vez existe la presencia de hongos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*), así como de bacterias en forma de bacilo, se trata de especies muy frecuentes en la microbiota epifítica y en los suelos.
3. A pesar de no encontrar diferencias significativas entre las cepas empleadas, el rol desempeñado por la Sc. VINAZA y en segundo lugar la UNEFM-16, medido a través de su crecimiento en los distintos medios de cultivo, es indicativo que estas levaduras pueden adaptarse fácilmente a sustratos complejos como la vinaza.
4. En el medio de cultivo vinaza al 40 % fue donde se obtuvo una respuesta más cercana a la del medio comercial, es decir, el aumento de la concentración de vinaza en los medios evaluados promueve el crecimiento de esta levadura.

REFERENCIAS

1. Sigüencia, J.; Delgado, J.; Posso, F.; Sánchez, J. (2020). Estimación del potencial de producción de bioetanol para los residuos de la corteza del cacao en Ecuador. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, **2020**, 2, 3.
2. Del-Gobbo, L.M.; Colin, V.L. Fungal technology applied to distillery effluent treatment. In: Prasad, R.; Aranda, E., editors.: Springer, **2018**. p. 185-197.
3. Chirinos, E.; Ferrer, J.; Barreto, G. *Tratamientos biológicos para vinazas de destilería*. Presentado en el IV Simposio Internacional de Química, Cayo Santa María, Villa Clara, Cuba, junio 7-10. **2013**.
4. Ferrer, J. Estudio de la oxidación de la vinaza del agave cocui mediante procesos fenton y foto fenton. Trabajo especial de grado como requisito para optar al título de magister en ingeniería química. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela. **2009**.
5. Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos. Decreto N° 883, Gaceta Oficial N° 5021, Venezuela. **1995**.
6. España, E.; Mijangos, J.; Barahona, L.; Domínguez, J.; Hernández, G.; Alzate, L. Vinasses: characterization and treatments. *Waste Management & Research*. **2011**, 29, 12, 1235-1250.
7. Parsaee, M.; Kiani, M.; Karimi, K. A review of biogas production from sugarcane vinasse. *Biomass and Bioenergy*. **2019**, 122, 117-125.
8. Fito, J.; Tefera, N.; Kloos, H.; VanHulle, S.W.H. Anaerobic treatment of blended sugar industry and ethanol distillery wastewater through biphasic high rate reactor. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. **2018**, 53, 7, 676-685.
9. Tiwari, P.C.; Warade, A. Technology for waste management in distillery. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. **2015**, 9, 9, 105-108.
10. Mornadini, M.; Quaiá, E. Alternativas para el aprovechamiento de la vinaza como subproducto de la actividad sucroalcoholera. *Avance Agroindustrial*. **2013**, 34, 2, 1-12.
11. Noa, A.; Pérez, O.; Zumalacárregui, L.; Pérez, J.L. Simulation of concentration and incineration as an alternative for vinasses' treatment. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. **2020**, 19, 3, 1265-1275.
12. Christofolletti, C.A.; Escher, J.P.; Correia, J.E.; Urbano, J.F.; Fontanetti, C.S. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. *Waste Management*. **2013**, 33, 2752-2761.
13. Alonso, D.; Garrido, N.; Pérez, O.; Zumalacárregui, L. Alternativas tecnológicas para reducir el volumen de las vinazas de la industria alcoholera y su tratamiento. *Centro Azúcar*. **2016**, 43, 1, 70-79.
14. Guardia, L.; Ruiz, M. Reutilización de vinazas producidas durante la destilación alcohólica. Tesis para optar el título de Biólogo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. **2010**.
15. Yegres, F.; Fernández, G.; Padín, C.; Rovero, L.; Richard, N. *Saccharomyces cerevisiae* en la fabricación del licor de Cocuy. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, **2003**, 23, 1, 51-54.
16. Barreto, G. Tópicos avanzados de Microbiología. Universidad de Camagüey. Cuba. **2012**.
17. Romero, M.; Silva, M. Evaluación de cultivos hidropónicos de pimentón utilizando soluciones nutritivas a base de vinaza de cocuy. Trabajo especial de grado para optar al título de ingeniero químico. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Coro, Venezuela. **2007**.
18. Campos, Y.; Chirinos, E. Efectos de la incorporación de una mezcla vinaza de cocuy- vermicompost sobre las propiedades químicas y biológicas del suelo. Caso Serie "El Jebe" municipio Miranda del estado Falcón. Trabajo especial de grado para optar al título de Especialista en calidad ambiental. Instituto Universitario de Tecnología "Alonso Gamero", Coro, Venezuela. **2010**.
19. Leal, I.; Chirinos, E.; Leal, M.; Morán, H.; Barrera, W. Caracterización fisicoquímica de la vinaza del Agave cocui y su posible uso agroindustrial. *Multiciencias*. **2003**, 3, 2, 83-88.
20. Mendoza, M. Importancia de la identificación de levaduras. *Rev. Soc. Ven. Microbiología*. **2005**, 25, 1, 15-23.
21. Fajardo, E.; Sarmiento, S. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de grado para obtener el título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. **2007**.
22. CIATEJ. Ciencia y tecnología del tequila; avances y perspectivas (Primera ed.). México. **2004**.
23. Leal, I.; Miquilena, R.; Morán, H. Evaluación del proceso de destilación del Cocuy de Pecaya a partir de la composición de los volátiles mayoritarios. *Multiciencias*. **2007**, 7, 2, 181-189.
24. Silva, A.; Varesche, M.; Foresti, E.; Zaiat, M. Sulphate removal from industrial wastewater using a packed-bed anaerobic reactor. *Process Biochemistry*. **2002**, 37, 9, 927-935.
25. Pelczar, M.J.; Reid, R.D.; Chan, E.C.S. Microbiología. McGraw-Hill. México. pp. 211-214; 223. **1991**.

26. Pérez, B.; Matallana, E. Monitoring stress-related genes during the process of biomass propagation of *Saccharomyces cerevisiae* strains used for wine making. *Applied and environmental Microbiology*. **2005**, 71, 11, 6831-6837.
27. Cáceres, G.; López, A. Modelamiento microbiológico para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo especial de grado para optar al título de ingeniería en producción agroindustrial. Facultad de Ingeniería. Universidad de la Sabana. Bogotá, Colombia. **2002**.
28. Sanz,; Montero, K.; Díaz, R. Utilización de la vinaza como alternativa para aliviar el efecto destructivo del vertimiento de desechos en la bahía de Santiago de Cuba. *Tecnología Química*. **2005**, XXV, 2, 32-38